

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08249

研究課題名(和文) ダウン症関連白血病における転写制御破綻機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of transcriptional dysregulation mechanisms in Down syndrome-related Leukemia

研究代表者

金崎 里香 (Kanezaki, Rika)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：60722882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症新生児の約10%は、未熟な巨核球が一過性に増殖する血液疾患(TAM)を発症する。TAM症例は多くが一旦寛解するものの、高率に巨核球性白血病(ML-DS)へと進展する。本研究の目的は、ML-DS移行の予防と予後の改善を目指し、ML-DS発症の分子機構を明らかにすることである。最新の研究では、巨核球系分化に必須の転写因子GATA1と協調して機能する(またはその可能性の高い)因子の変異が、ML-DSで高頻度に検出されている(未発表)。GATA1を中心とした遺伝子発現制御の破綻が、ML-DS発症の共通したメカニズムであるという仮説のもと、白血病発症の鍵となる遺伝子発現制御の解明を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TAMからML-DSへ進展する分子メカニズムを解明することは、ML-DS発症を予防する上で重要であり、ML-DSの新たな治療法を開発する際にも必要な知見となる。また、本研究における転写因子の機能解析データを提供することは、医学のみならず基礎的な分子生物学分野の発展に対しても貢献しうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Approximately 10% of newborns with Down syndrome develop a transient abnormal myelopoiesis (TAM), a disease characterized by the transient proliferation of immature megakaryocytes. Most TAMs go into remission, but a high percentage of patients develop megakaryocytic leukemia (ML-DS). The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanisms of ML-DS development in order to prevent ML-DS transition and improve prognosis. In our recent study, mutations in factors that function (or are thought to function) in cooperation with GATA1, a transcription factor essential for megakaryocyte differentiation, were frequently detected in ML-DS (unpublished). Based on the hypothesis that dysregulation of gene expression centered on GATA1 is a common mechanism in the development of ML-DS, the regulatory mechanisms of gene expression involved in the pathogenesis of leukemia were investigated.

研究分野：小児血液学

キーワード：転写因子 白血病

1. 研究開始当初の背景

ダウン症は、ヒトで最も多い染色体異常症であり、21番染色体が3本あること(トリソミー21)に起因する一連の障害や症状の総称である。ダウン症新生児の約10%は、巨核球の分化に必須である転写因子GATA1の、体細胞遺伝子変異を伴うTAMを発症する。TAM症例の多くは自然寛解する一方で、このうち約20%もの症例がML-DSを発症している。このML-DSとは、TAMの芽球が付加的遺伝子変異を獲得して白血病化したものである。しかしながら、現状ではどのようなTAM症例がML-DSに移行するかを予測できず、ML-DS発症の予防は困難な状況である。

TAMとML-DSの大きな特徴は、転写因子GATA1の体細胞遺伝子変異が、ほぼ全例に検出されるということである。GATA1変異は完全長のGATA1タンパク産生を障害し、代わって、転写活性化ドメインのN末端1-83アミノ酸を欠く短縮型GATA1(GATA1s)の発現をもたらす。GATA1sはGATA1と同じDNA認識モチーフ(WGATAR)に結合し、転写活性化能はGATA1の4割程度に留まるものの、転写因子としての機能を保持している。TAMにおいては、トリソミー21とGATA1変異以外の異常は稀である。一方、ML-DSではコヒーシ複合体の遺伝子変異に加え、転写因子IRX1、ZBTB7A遺伝子変異やRUNX1遺伝子の部分的縦列重複(PTD)を含む変異がそれぞれ約20%と高頻度に検出された(投稿準備中)。これらの遺伝子変異によって、具体的にどのようにしてML-DSが発症するのか?というのが本研究の問いである。本研究により、TAMからML-DSへの移行の予防や、ML-DSの新規治療法開発につながる知見が得られることを期待する。

2. 研究の目的

本研究は、ML-DS発症の予防と予後の改善を目指し、ML-DS発症の分子機構を明らかにすることを目的とするものである。本研究では、主にRUNX1-PTDとIRX1のML-DSにおける機能の解明、そしてGATA1sとの相互作用の検証を行い、ML-DS発症に関わる遺伝子発現制御の破綻機序を検討することとした。

3. 研究の方法

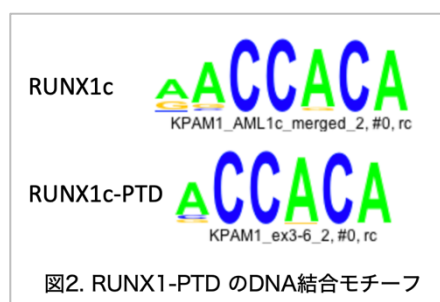
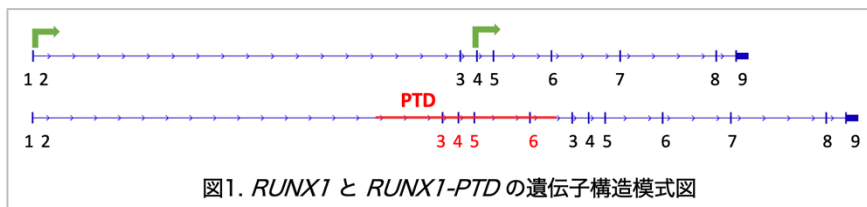
(1) RUNX1-PTDについては、変異が検出された検体でロングリードシーケンスによるRUNX1-PTD mRNA発現の確認を行い、ML-DS由来細胞株KPAM1でのクロマチン免疫沈降-シーケンス(ChIP-seq)によりDNA結合配列を明らかにし、続いて線維芽細胞QT6でのプロモーターアッセイにより転写活性化能の検証およびGATA1との相互作用についての評価を試みた。

(2) IRX1については、まずTAMとML-DS検体における発現を定量的逆転写PCRで確認した。次にCUT&RUN(Cleavage Under Target & Release Using Nuclease)アッセイでIRX1のゲノム上のDNA結合領域を解析し、GATA1標的遺伝子のGPIBAプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを用い、レポーターアッセイを実施した。また、IRX1の免疫沈降によりGATA1との相互作用について評価することとした。

4. 研究成果

(1) RUNX1-PTDについて

t(8;21)転座によるRUNX1-RUNX1T1融合遺伝子で有名なRUNX1は、造血系のマスター因子と呼ばれ、血小板の形成にも重要な役割を担っている転写因子である。RUNX1はGATA1sと相互作用を示し、転写活性に相乗効果をもたらす[1]。通常の全エクソン解析では検出が難しいため、存在はほとんど知られていないが、申請者らの研究ではRUNX1-PTDはML-DSでのRUNX1変異の8割に達している(投稿準備中)。図1の上はRUNX1遺伝子を、下はエクソン3から6を含む領域の重複を有するRUNX1-PTDの例を示した。数字はエクソンの番号である。始めに、PTD変異が検出されたML-DS検体で実際にRUNX1-PTD mRNAが発現しているかどうかをロングリードシーケンサーの1つである、ナノポアシーケンサーにて確認した。RUNX1遺伝子からは通常、エクソン1から転写されるRUNX1cと、エクソン4から転写されるRUNX1b、エクソン4から転写されエクソン7と8の間に独自の最終エクソンを有するRUNX1aの3種類のisoformが作られるのだが、全てのisoformについてPTD分子が発現していた。このうち、主要なisoformであるRUNX1cで実験を行うこととした。



ML-DS 由来細胞株 KPAM1 で、内在性の RUNX1 と区別するために Xpress タグ付き RUNX1c あるいは RUNX1c-PTD の発現誘導を行い、抗 Xpress 抗体で ChIP-seq を実施した。RUNX1c-PTD では RUNT ドメインという DNA 結合領域が重複していることで、ゲノム上の結合配列に変化が生じていると推測されたが、実際には RUNX1c との間に特に違いは見られなかった (図 2)。また、RUNX1c と RUNX1-PTD のゲノム上の結合ピーク領域は 7 割が重複し、両者の類似性は高かった。

次に、巨核球系遺伝子 *GPIBA* のプロモーターアッセイを実施した。このプロモーターでは GATA1 結合配列と RUNX1 結合配列が隣接していて、両因子の相乗効果が見られる [1]。GATA1 と RUNX1c-PTD の転写活性化は、GATA1 と RUNX1c の 7 割程度に減少したものの、依然として GATA1 と RUNX1c-PTD の相乗効果は認められた。

次に 293 細胞で RUNX1c-PTD の局在を免疫染色で観察した。RUNX1c-PTD は RUNX1c 同様、主に核に存在していたが、細胞質への局在も観察された。本研究では RUNX1c-PTD が RUNX1 よりも転写活性化能がやや低いことがわかったものの、ゲノム上の独自の標的遺伝子といったものも見られず、RUNX1c-PTD と RUNX1 の大きな性質の違いは捉えられなかった。ML-DS 発症に関係する RUNX1c-PTD の機能を明らかにするには、更なる研究が必要である。

(2) IRX1について

IRX1は、Iroquoisホメオボックスファミリーに属する、未だ機能不明の転写因子である。IRX1は、胃がんや頭頸部がんにおける腫瘍抑制因子として同定されている。ML-DS症例では、高頻度に機能喪失型の変異が検出されている (投稿準備中)。正常の造血細胞においては、巨核球/赤血球前駆細胞 (MEP) で高発現しており、TAMとML-DS検体でも発現を確認した (図3)。従って、IRX1は巨核球の分化に関与する因子と推測される。

ML-DS細胞株KPAM1を用いたIRX1発現誘導実験では、野生型IRX1の場合は巨核球系への分化と細胞周期停止が観察された一方で、機能喪失型変異体ではその影響は部分的であった (投稿準備中)。このIRX1発現誘導実験の遺伝子発現プロファイルを調べると、野生型IRX1はGATA1の標的遺伝子の発現量増加をもたらした一方で、GATA1や、GATA1と標的遺伝子を共有する転写因子GATA2のmRNA量は変動していなかった。Nagelらによれば、巨核球系細胞株でGATA1またはGATA2をsiRNAでノックダウンするとIRX1が発現低下したとのことだが [2]、申請者がML-DS由来細胞株CMK11-5を用いてGATA1 siRNA実験を行った限りでは、そのような現象は観察されなかったため、GATA1がIRX1発現を調節している可能性は、現時点では低いように思われた。

IRX1に対する良い抗体はほとんど市販されていないため、3xFLAGタグをIRX1発現誘導ベクターに取り付け、KPAM1にて抗FLAG抗体を用いたChIP-seqを実施したが、予想外にもIRX1のゲノムDNAへの結合を検出できなかった。従って、IRX1は直接ゲノムDNAに結合せず、GATA1sのco-factorとして機能している可能性が考えられた。そこで、co-factorのゲノムDNA結合を検出可能と言われるCUT&RUNアッセイをChIP-seqと同様の実験系で実施したものの、残念ながらこれまでに信頼できるデータが得られていない。IRX1に限らず、これまでIRXファミリーのChIP-seqやCUT&RUNのデータは一切発表されておらず、なんらかの理由でゲノムへの結合検出が難しい因子である可能性がある。ChIP-seqが困難なco-factorについて、CUT&RUNを改良したアッセイ法を記した論文 [3] を参考に、現在試行しているところである。

IRX1がGATA1のco-factorである可能性を検討するため、上述の*GPIBA*のプロモーターアッセイをKPAM1でIRX1発現誘導した上で行ったが、IRX1発現誘導の有無はGATA1の転写活性化に影響を及ぼさなかった。また、GATA1とIRX1の免疫沈降実験を同様のKPAM1のIRX1発現誘導系で実施したものの、両者が結合しているという確証は得られなかった。IRX1は直接GATA1の標的遺伝子の活性化に関与しておらず、GATA1と別の経路から細胞分化を促進することでGATA1標的遺伝子の発現をあげている可能性と、ゲノムの高次構造を変化させることでGATA1標的遺伝子を活性化させている可能性が考えられた。いずれにしても、IRX1は巨核球の正常な分化に重要な因子であることから、ML-DS発症と*IRX1*変異との関連性について引き続き明らかにしていく必要がある。

IRX1がGATA1のco-factorである可能性を検討するため、上述の*GPIBA*のプロモーターアッセイをKPAM1でIRX1発現誘導した上で行ったが、IRX1発現誘導の有無はGATA1の転写活性化に影響を及ぼさなかった。また、GATA1とIRX1の免疫沈降実験を同様のKPAM1のIRX1発現誘導系で実施したものの、両者が結合しているという確証は得られなかった。IRX1は直接GATA1の標的遺伝子の活性化に関与しておらず、GATA1と別の経路から細胞分化を促進することでGATA1標的遺伝子の発現をあげている可能性と、ゲノムの高次構造を変化させることでGATA1標的遺伝子を活性化させている可能性が考えられた。いずれにしても、IRX1は巨核球の正常な分化に重要な因子であることから、ML-DS発症と*IRX1*変異との関連性について引き続き明らかにしていく必要がある。

引用文献

1. Xu G., Kanezaki R. et al. Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Leukemia*. 20, 1002-1008 (2006).
2. Nagel S. et al. The hematopoietic TALE-code shows normal activity of IRX1 in myeloid progenitors and reveals ectopic expression of IRX3 and IRX5 in acute myeloid leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 3192 (2022).
3. Zambanini G. et al. A new CUT&RUN low volume-urea (LoV-U) protocol optimized for transcriptional co-factors uncovers Wnt/ β -catenin tissue-specific genomic targets. *Development*. 149, dev201124 (2022).

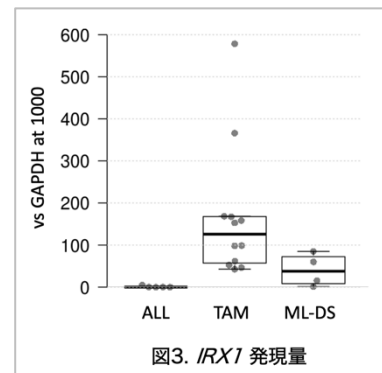


図3. IRX1 発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	伊藤 悦朗 (Ito Etsuro) (20168339)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	
連携研究者	土岐 力 (Toki Tsutomu) (50195731)	弘前大学・医学研究科・講師 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関